

# ISOLASI BACILLUS THURINGIENSIS DARI LARVA DAN PENGUJIAN PATOGENISITASNYA TERHADAP LARVA NYAMUK VEKTOR

Blondine Ch. P \*, Umi Widyastuti \*, dan Widiarti \*

## ABSTRACT

*A study to evaluate pathogenic organisms as cause of mosquito larvae death was conducted at Wonokerto and Pabelan villages, Salatiga Luar Kota subdistrict, Semarang regency in Central Java from May 1991 through December 1991. Bacterial isolation from dead larvae showed that 31 B. thuringiensis isolates were obtained from 31 larvae samples collected from 2 location e.g Wonokerto village (3 samples), Pabelan village (28 samples). Nineteen isolates (61,3%) showed a pathogenicity of more than 50% to third toward instar larvae of Aedes aegypti and Culex quinquefasciatus respectively 24 hours after exposure.*

*This study shows the possible use of B. thuringiensis for biologic control of mosquitoes which can act as vectors for human diseases.*

## PENDAHULUAN

Nyamuk yang berperan sebagai vektor malaria, DHF dan filariasis masih merupakan masalah yang penting bagi kesehatan masyarakat di Indonesia. Berbagai macam insektisida kimia telah digunakan dalam upaya pengendalian vektor penyakit. Penggunaan insektisida dalam pengendalian vektor secara berulang-ulang telah menimbulkan masalah baru yaitu timbulnya resistensi vektor, matinya musuh-musuh alami atau hewan-hewan lain yang bukan sasaran, dan pencemaran lingkungan. Salah satu cara yang cukup potensial dan tidak mempunyai efek samping

adalah pengendalian secara hayati khususnya dengan bakteri patogen seperti *Bacillus thuringiensis*. Bakteri ini membentuk spora dan masing-masing spora menghasilkan kristal protein toksin (delta endotoksin). *B. thuringiensis* mempunyai toksisitas tinggi terhadap berbagai spesies nyamuk, tidak berbahaya bagi organisme bukan sasaran dan mamalia serta tidak menimbulkan pencemaran lingkungan<sup>1</sup>.

Dalam rangka pengembangan jasad hayati sebagai sarana pengendali vektor di Indonesia, pada tahun 1989/1990 dengan bimbingan Dr. J.S. Pillai, Konsultan WHO dari New Zealand,

---

\* Stasiun Penelitian Vector Penyakit, Puslit Ekologi Kesehatan, Salatiga, Jawa Tengah.

Stasiun Penelitian Vektor Penyakit (SPVP) melakukan pengumpulan larva pada habitat sawah di Kecamatan Beringin, dan menemukan larva nyamuk yang terinfeksi oleh patogen.

Berdasarkan hal tersebut di atas, maka dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengisolasi bakteri patogen dari larva berbagai jenis nyamuk. Hasil penelitian tersebut dilaporkan dalam tulisan ini.

## BAHAN DAN CARA KERJA

### Lokasi

Penelitian ini dilakukan di Desa Wonokerto (Kecamatan Beringin) dan Desa Pabelan (Kecamatan Salatiga Luar Kota), Kabupaten Semarang dipilih sebagai daerah penelitian, sebab daerah tersebut merupakan daerah persawahan sepanjang tahun yang merupakan habitat larva nyamuk.

### Cara kerja

Pengumpulan larva nyamuk dilakukan dengan menggunakan ciduk email bundar (volume 350 ml) secara acak di habitat sawah di daerah penelitian. Pengambilan sampel dilakukan secara rutin 2 minggu satu kali selama satu tahun.

Larva yang diperoleh dari hasil penangkapan dibawa ke laboratorium. Pengamatan awal terhadap larva (baik yang masih hidup maupun yang sudah mati) dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Larva hidup yang terinfeksi patogen menunjukkan gejala-gejala seperti tampak lemah tidak mau makan, lumpuh dan akhirnya mati. Di samping gejala-gejala tersebut di atas larva juga menunjukkan perubahan warna yang

mencolok seperti warna hitam, putih, kuning tua, coklat kehitaman bergantung pada jenis patogen penyebabnya.

Sebanyak 1-5 ekor sampel larva nyamuk yang diduga terinfeksi patogen bakteri dimasukan ke dalam tabung reaksi steril dimaserasi dengan batang gelas kecil, kemudian ditambahkan 9 ml NaCl 0.85 % dan didiamkan selama 5 menit. Dari sampel tersebut dibuat pengenceran  $10^{-1}$ - $10^{-5}$ , masing-masing dipanaskan pada suhu  $70^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit. Tujuan dipanaskan untuk menghambat pertumbuhan bakteri lain terutama bakteri non spora. Masing-masing seri pengenceran diinokulasikan pada media agar nutrien (yang berisi bahan bacto beef extract 3 gram, bacto peptone 5 gram dan bacto agar 15 gram per 1 liter aquadest), kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$ . Terhadap koloni patogen dilakukan pengecatan dengan menggunakan metoda Chilcott & Wigley<sup>2</sup>, untuk mendeteksi kristal protein. Cara pengecatan adalah dengan membuat preparat olesan dari koloni patogen ditetesi dengan "Naphtalen black" selama 2 menit "Gurr's improved R66 Giemsa" selama 1 menit. Ada tidaknya kristal dilihat di bawah mikroskop pada pembesaran 1000 kali. Dari koloni positif dibuat biakan murni pada media agar nutrien, diinkubasikan pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$  selama 48 jam. Biakan murni yang diperoleh diinokulasikan pada media NYSMA "slope", diinkubasikan pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$  selama 4 hari. Dari biakan murni (NYSMA "slope") dilakukan uji hayati dengan tujuan untuk mengetahui patogenisitas dari biakan murni tersebut, dengan cara sebagai berikut :

Biakan murni sebanyak 2 "loopfull" (2 ose penuh) dimasukan kedalam "shake glass" (gelas goyang) ukuran 250 ml yang diisi dengan 50

ml "Tryptose Phosphate Broth" (Oxoid, UNIPATH LTD, BASINGSTOKE, HAMPSHIRE, ENGLAND). Sampel tersebut digoyang dengan menggunakan penggoyang pada suhu kamar selama 48 jam. Sebanyak 15 ml sampel yang sudah digoyang dimasukkan ke dalam mangkok plastik yang diisi dengan 100 ml air suling dan 25 ekor jentik *Aedes aegypti* instar III (umur 6-7 hari). Sebagai kontrol, mangkok plastik hanya dengan 150 ml air suling dan 25 ekor jentik *Ae. aegypti* instar III. Ulangan dilakukan sebanyak 3 kali. Pengamatan dilakukan 24 jam sesudah perlakuan. Uji hayati terhadap *Culex quinquefasciatus* dilakukan seperti cara c.

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari pengambilan sampel larva nyamuk diperoleh 197 ekor larva *Anopheles vagus* dari Desa Wonokerto (sawah). Dari jumlah tersebut 19,3 % terinfeksi oleh patogen. Sedangkan dari

Desa Pabelan (sawah) diperoleh sebanyak 818 ekor larva *An. vagus* dan 304 ekor larva *Cx. bitaeniorhynchus*, masing-masing spesies terinfeksi oleh patogen berturut-turut 10,9 % dan 23,0 %. Spesies larva nyamuk *Cx. vishnui* dan *Cx. tritaeniorhynchus* yang ditemukan di dua desa tersebut belum ada yang terinfeksi patogen (Tabel 1).

Hasil pengambilan sampel larva nyamuk di dua lokasi penelitian tersebut, ternyata larva *An. vagus* ditemukan paling dominan dibandingkan spesies lain sehingga kemungkinan/peluang untuk mendapatkan larva yang terinfeksi lebih besar. Patogen juga ditemukan pada larva *Cx. bitaeniorhynchus* diperoleh dalam jumlah banyak di Desa Pabelan. Dari spesies lain belum ditemukan patogen karena jumlah sampel yang diambil kurang banyak.

**Tabel 1. Hasil isolasi *Bacillus thuringiensis* dari larva nyamuk di dua daerah penelitian pada bulan Mei 1991 s/d Desember 1991.**

No.	Lokasi	Habitat larva	Spesies nyamuk	Jumlah larva		Hasil isolasi	
				Terkumpul	Diduga terinfeksi patogen (%)	<i>B. thuringiensis</i>	<i>Bacillus</i> spp.
1.	Wonokerto	Sawah	<i>Anopheles vagus</i>	197	38 (19,3)	+	-
			<i>Culex vishnui</i>	70	0 (0,0)	-	-
2.	Pabelan	Sawah	<i>An. vagus</i>	818	89 (10,9)	+	-
			<i>Cx. bitaeniorhynchus</i>	304	70 (23,0)	-	-
			<i>Cx. vishnui</i>	164	0 (0,0)	-	-
			<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	5	0 (0,0)	-	-

Hasil isolasi sampel larva nyamuk yang terinfeksi patogen dari masing-masing lokasi ditemukan adanya bakteri patogenik *Bacillus thuringiensis*. Sedangkan isolasi dari larva nyamuk yang tampak sehat (tidak terinfeksi patogen) ternyata negatif (Tabel 1). Dari hasil pengecatan terlihat adanya kristal protein toksik *B. thuringiensis* tercetak hitam, sedangkan spora-nya tercetak ungu (Gambar 1).

Dari 31 isolat *B. thuringiensis* yang telah diuji patogenisitasnya, diperoleh 19 isolat (61,3%) yang mempunyai patogenisitas lebih dari 50 % (50,7 - 98,7 %) dan 12 isolat (38,7%) kurang dari 50 % (4,0 - 49,3 %) terhadap larva *Ae. aegypti* dan *Cx. quinquefasciatus* (Tabel 2). Perbedaan patogenisitas tersebut antara lain disebabkan oleh banyak sedikitnya toksin

(kristal) yang termakan, dan adanya perbedaan serotipe<sup>3</sup>. Mengingat bahwa 61,3 % dari isolat mempunyai patogenisitas tinggi maka serologi akan dilakukan guna mengetahui serotipenya, untuk kemudian dikembangkan di laboratorium.

## KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa lokasi penelitian (Desa Wonokerto dan Pabelan) mempunyai potensi sebagai sumber bakteri patogen lokal yang kemungkinan digunakan sebagai jasad pengendali larva nyamuk. Oleh karena itu pencarian bakteri patogen di lokasi tersebut perlu dilanjutkan untuk kemudian dikembangkan di laboratorium.



Gambar 1. Pengecatan kristal *Bacillus thuringiensis* (K = kristal, S = spora)

**Tabel 2. Uji patogenisitas *Bacillus thuringiensis* yang ditemukan terhadap larva *Aedes aegypti* dan *Culex quinquefasciatus* instar III selama 24 jam.**

No	Lokasi	Habitat larva	Spesies nyamuk asal isolat	Kematian larva nyamuk terhadap <i>B. thuringiensis</i> *				
				Jml sampel/ isolat pos.	Isolat ( > 50 %)		Isolat ( < 50 %)	
					<i>Aedes aegypti</i>	<i>Culex quin- quefasciatus</i>	<i>Aedes aegypti</i>	<i>Culex quin- quefasciatus</i>
1.	Pabelan	Sawah	<i>Anopheles vagus</i>	3/3	3 (70,7-80,0)	3 (82,7-92,0)	-	-
2.	Pabelan	Sawah	<i>An. vagus</i>	10/10	6 (88,0-96,0)	7 (50,7-96,0)	4 (5,3-44,0)	3 (9,3-20,0)
			<i>Cx. bitae- niorhynchus</i>	18/18	10 (53,3-98,7)	9 (50,7-69,3)	8 (4,0-49,3)	9 (5,3-38,7)
	Jumlah			31/31	19 (53,3-98,7)	19 (50,7-96,0)	12 (4,0-49,0)	12 (5,3-38,7)

\* Rata-rata dari 3 ulangan.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis sampaikan kepada Dr. Sustriayu Nalim, Pjh. Kepala Stasiun Penelitian Vektor Penyakit, yang telah membina dan memberi saran hingga selesainya penulisan makalah ini, dan para teknisi Laboratorium Jasad Hayati SPVP Salatiga atas bantuan yang telah diberikan.

## DAFTAR RUJUKAN

1. Sudomo, M., S. Aminah, H. Mathis, dan Y.H. Bang (1981). Small scale field trials of *Bacillus thuringiensis* H-14 against different mosquito Vector species in Indonesia. WHO/VBC/81.836.
2. Chilcott, C.N. and Wigley, P.J. 1988. Technical notes: an improved method for differential staining of *Bacillus thuringiensis* crystals. Letters in Applied Microbiology. 7 : 67- 70.
3. WHO, 1979. Data sheet on the biological control agent. *Bacillus thuringiensis* serotype H - 14. WHO/VBC/79.750.13p.